

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-511110

(P2003-511110A)

(43) 公表日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 M 29/00		A 6 1 M 29/00	4 C 0 8 1
A 6 1 L 31/00		A 6 1 L 31/00	Z 4 C 1 6 7
33/00		A 6 1 M 29/02	
A 6 1 M 29/02		A 6 1 L 33/00	T

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2001-527865(P2001-527865)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月5日 (2000.10.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年4月5日 (2002.4.5)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 2 7 5 6 5
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 2 4 8 6 6
 (87) 国際公開日 平成13年4月12日 (2001.4.12)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 5 7 , 9 6 0
 (32) 優先日 平成11年10月6日 (1999.10.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ ベン ステイト リサーチ ファンデーション
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16802,
 ユニバーシティ パーク, オールド
 メイン 304
 (72) 発明者 ケスター、マーク
 アメリカ合衆国 16802-7000 ペンシル
 ベニア州 ユニバーシティ パーク テク
 ノロジー センター 113
 (74) 代理人 弁理士 中島 淳 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 身体脈管における再狭窄を予防するシステムおよび装置

(57) 【要約】

本発明は、内壁面を有する身体の内管または腔における侵襲性手技後の狭窄および/または再狭窄を予防するためのシステムおよび装置に関し、該システムは、身体の内管または腔の内壁面に沿った所望の位置で、増殖停止性の脂質に由来する生物学的活性物質でコーティングされた装置を挿入することを包含する。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 内壁面を有する身体の脈管または腔における侵襲性手技後の再狭窄を予防するためのシステムであって、身体の脈管または腔の内壁面に沿った所望の位置で増殖停止性脂質由来生物学的活性物質またはその誘導体でコーティングされた装置を挿入することを包含する、システム。

【請求項 2】 前記装置がカテーテルまたはステントである、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】 前記増殖停止性脂質由来生物学的活性物質がセラミド、ジメチルスフィンゴシン、エーテル結合ジグリセリド、エーテル結合ホスファチジン酸およびスフィンガニン、またはその誘導体からなる群から選択される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】 さらに下記：

(a) 増殖停止性脂質由来生物学的活性物質を含む治療用装置を内壁面に沿って所望の位置に挿入する工程；

(b) 該装置を損傷もしくは障害された組織を有する脈管または腔の一部分内に設置する工程；

(c) (i) 物質を供給し、(ii) 障害部分から粥腫または組織片を除去する、或いは足場として寄与する工程；および

(d) 脈管または腔の障害された部分に処置を施す工程、
を包含する、請求項 3 に記載のシステム。

【請求項 5】 セラミド誘導体が 2 ～ 10 個の炭素を含む細胞浸透性脂肪酸である、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 6】 注入ポートを介するセラミドの送達でセラミドコーティングされた膨張バルーンより遠位である、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 7】 セラミド誘導体が C₆-セラミドである、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 8】 前記装置がバルーン血管形成術またはステント設置によって誘発される新生内膜過形成を減少させる、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 9】 前記装置が血管傷害部位に治療的用量のセラミドを送達する

(3)

、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 10】 前記装置が、血管壁が傷害された後に細胞周期に入る血管平滑筋の割合を減少させることによって新生内膜過形成を減少させる、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 11】 前記装置が、有意なアポトーシスを誘発することなく血管平滑筋細胞の増殖および移動する割合を減少させる、請求項 10 に記載のシステム。

【請求項 12】 内壁面を有する身体の脈管または腔における侵襲性手技後の狭窄を予防するためのシステムであって、身体の脈管または腔の内壁面に沿った所望の位置で増殖停止性脂質由来生物学的活性物質またはその誘導体でコーティングされた装置を挿入することを包含する、システム。

【請求項 13】 前記増殖停止性脂質由来生物学的活性物質がセラミド、ジメチルスフィンゴシン、エーテル結合ジグリセリド、エーテル結合ホスファチジン酸およびスフィンガニンまたはその誘導体からなる群から選択される、請求項 12 に記載のシステム。

【請求項 14】 内壁面を有する身体の脈管または腔における侵襲性手技後の狭窄および再狭窄を予防するための装置であって、増殖停止性脂質由来生物学的活性物質またはその誘導体のコーティングを含む、装置。

【請求項 15】 前記増殖停止性脂質由来生物学的活性物質がセラミド、ジメチルスフィンゴシン、エーテル結合ジグリセリド、エーテル結合ホスファチジン酸およびスフィンガニンまたはその誘導体からなる群から選択される、請求項 14 に記載の装置。

【請求項 16】 セラミド誘導体が 2 ～ 10 個の炭素を含む細胞浸透性脂肪酸である、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】 セラミド誘導体が C₆-セラミドである、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 18】 前記身体の脈管が血管である、請求項 15 に記載の装置。

(4)

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

冠動脈および他の脈管における経皮経管血管形成術（PTCA）後の血管開存維持において、再狭窄は、主要な合併症として残り続ける。再狭窄は、脈管のリコイル、ネガティブ血管リモデリング、残存粥腫の負荷および新生内膜過形成（neointimal hyperplasia）を含む、複数因子の帰結である。新生内膜過形成は、血管平滑筋（VSM）細胞の移動および増殖と、その後の傷害部位での細胞外マトリックス成分の沈着を反映する。かなりの証拠から、再狭窄では、増殖因子がVSM細胞を刺激して増殖させ、内膜の肥厚を招くことが示唆されている。全患者のおおよそ40%が、血管形成術の手技後6ヵ月以内に有意な管腔の狭小化を発症する。その結果、血管形成術の初期の治療効果にもかかわらず、術後数ヵ月以内に、患部血管における血流が再度あやうくなり得る。アンギオテンシン転換酵素阻害剤、抗凝固剤およびスタチンを含む従来の治療法は、伸長傷害（stretch injury）後の新生内膜過形成を予防または軽減するのには無効である。血管内放射線療法は、動物およびヒト両方の試験で幾らかの成功を収めているが、動脈に対するこの治療法の長期的な有害作用は適切に評価されていない。

【0002】

セラミドは、スフィンゴミエリンの増殖停止性代謝物であり、細胞膜の主要な脂質成分である。より詳細には、セラミドは、原形質膜で見い出され得る複合脂質である。セラミドは、炎症性サイトカイン（IL-1、TNFおよびCD95リガンド）に誘発される増殖停止および／または細胞死の間に増強される過程である、スフィンゴミエリナーゼによるスフィンゴミエリン分解によって産生される。セラミドは、血管平滑筋増殖停止および／または特定キナーゼの直接的活性化によるアポトーシスを仲介し得る、生物学的活性物質として作用するように見える。塞栓除去用カテーテルのバルーン先端を介した細胞浸透性セラミドもしくは類似体の直接的かつ速やかな送達、またはステントのコーティングによる長期的な送達は、血管形成術後の再狭窄で観察されるVSM増殖を減少させるであろうという仮説が立てられた。

(5)

【0003】

セラミドは、インビトロで、c-Jun-N末端キナーゼ（JNK）を活性化し、同時に細胞外シグナルで制御されるキナーゼ（ERK）およびプロテインキナーゼB（PKB）を抑制することによって、VSM増殖を阻害することが公知である。しかし、細胞浸透性（cell-permeable）セラミドが、インビボでVSM増殖を減少させる可能性については、今まで試験されていない。障害された動脈、身体脈管または腔（cavity）を開通させるためのカテーテル使用も、例えば、本明細書中に援用される米国特許第5,599,307号にある通り、周知である。しかしながら、従来技術の治療装置それ自身は、動脈中に有意な量のVSM再増殖を誘発し、それは二次的な遮断または閉塞をもたらす（即ち、再狭窄）。

【0004】

（発明の概要）

本発明は、内壁面を有する身体の脈管または腔における侵襲性手技（例えば、血管または外科的インターベンション）後の、狭窄（狭小化）および／または再狭窄（再狭小化）を予防するためのシステムおよび装置に関し、該システムは、身体の脈管または腔の内壁面に沿った所望の位置で、増殖停止性であり脂質に由来する生物学的活性物質でコーティングされた装置を挿入することを包含する。物質を直接かつ速やかに作用部位に送達することにより、平滑筋細胞のその後の再増殖が予防され、これによって身体が最初の外科的インターベンション、例えば、血管形成術に対応して起こる炎症性反応を克服する。

【0005】

好ましい実施態様では、本発明は、頸動脈でのバルーン血管形成術により誘発された新生内膜過形成を有意に減少させる、セラミド処理を開示する。セラミドは、細胞外シグナルで制御されるキナーゼ（ERK）およびプロテインキナーゼB（PKB）の外傷関連性リン酸化を減少させることによって狭窄を緩和することが実証される。後述されるように、細胞浸透性セラミドの利用性は、バルーン血管形成術後の再狭窄を減少させる新規な治療法であることが証明された。

【0006】

（発明の詳細な説明）

(6)

本発明は、内壁面を有する身体の脈管または腔における侵襲性手技後の狭窄および／または再狭窄を予防するためのシステムおよび装置に関し、該システムは、身体の脈管または腔の内壁面に沿った所望の位置で、増殖停止性であり脂質に由来する生物学的活性物質でコーティングされた装置を挿入することを含む。該物質を直接かつ速やかに作用部位に送達することにより、平滑筋細胞のその後の再増殖が予防され、こうして身体が最初の外科的インターベンション、例えば、血管形成術に対応して起こる炎症性反応を克服する。本発明の処置に利用され得る装置は、単純なカテーテル／単純な（１個の）バルーン的设计、二元的バルーンカテーテル的设计またはステントを含むが、これらに制限されない。微小孔カテーテル设计、注入用カテーテル设计、回転式粥腫切除装置设计、ポリマー（例えば、ポリアクリル酸）コーティングされたバルーン设计、生体吸収性コーティング设计、ステントカバーおよび血管周囲マトリックスは全て、恐らく同じように利用され得る。

【0007】

「増殖停止性(growth arresting)」とは、細胞（例えば、血管平滑筋細胞）が、損傷組織から放出される増殖因子またはサイトカインにもはや反応しないことを意味する。「脂質に由来する」とは、その物質が膜内の脂質を代謝するために生成されることを意味する。従って、身体のこれらの化合物に対する最小の免疫学的／炎症性の反応がある。最後に、「生物学的活性な」とは、作用物質が、新たな遺伝子が活性化または不活化されて細胞の表現型を変化させる場所である核に、細胞の外膜から情報を伝達することを意味する。そのような抗分裂促進性物質の例には、セラミドおよびセラミド誘導体、例えば、低下した代謝に従う細胞浸透性の類似体および形態が含まれる。これらは、１-クロロおよび１-ベンゾイルセラミドを含むSN-1位での誘導体（これは、この位置でリン酸化されることはない）、並びにメチルカルバメート基または2-0-エチル置換基のようなSN-2位（アミド結合）での誘導体（これは、セラミダーゼによって分解されることはない）を含むが、これらに限定されない。さらに、これらのセラミド類似体の細胞浸透性形態が活用し得る。これらの細胞浸透性セラミドおよび／または誘導体の例は、2～10個の炭素を含み、SN-2位で短鎖脂肪酸を有する

(7)

(C6セラミド)。

【0008】

増殖停止性であり脂質に由来する生物学的活性物質の他の例は、ジメチルスフィンゴシン、エーテル結合ジグリセリド、エーテル結合ホスファチジン酸およびスフィンガニンを含むが、これらに限定されない。

【0009】

コーティングされる装置は、好ましくは、DMSO／エタノールを含むビヒクル中に浸漬し、実際のコーティング過程を滅菌環境内で行ない、有効量のコーティング物質を装置に残留させる。装置は、続いて、放射線滅菌に供され得る。セラミドコーティングされた装置は、疎水性および親水性コーティング、並びに吸収性マトリックスまたはポリマー・マトリックスからの送達用に最適化され得る。

【0010】

カテーテルおよび単一バルーン的设计を含む実施態様を示すものである図1に示されるように、付随バルーン10を有するカテーテル14は、動脈壁12に囲まれた管腔13中に挿入される。カテーテル先端15およびバルーン10は、特定の治療の間に使用するための増殖停止性脂質由来生物学的活性物質11でコーティングされ、血流を妨げる閉塞および／または狭小化した脈管の開通をもたらす。

【0011】

さらに好ましい実施態様では、本発明は、増殖停止性脂質由来生物学的活性物質をコーティングしたバルーンカテーテルおよび／またはステント、および内壁面を有する身体の脈管または腔における侵襲性手技後の再狭窄を予防するシステムに関し、該システムは、

(a) 治療用装置（例えば、塞栓除去用カテーテル上のバルーン、ステントおよび／または回転式粥腫除去装置）を挿入して、内壁面に沿った所望の位置で動脈の狭小化を減少させる工程、ここで該装置は増殖停止性脂質由来生物学的活性物質またはその誘導体でコーティングされている；

(b) 損傷もしくは障害された組織を有する脈管または腔の一部内で塞栓除去

(8)

用カテーテル上のバルーンを膨張するか又はステントを設置する工程；

(c) (i) (バルーン膨張により直接的かつ速やかに、またはステントを介して持続的な速度で) 物質を供給し、(ii) 障害部分から粥腫または組織片を除去する、および／または足場的装置として寄与する工程；および

(d) 脈管または腔の障害もしくは閉塞された部分に処置を施す工程、を包含する。

【0012】

そのような工程は、損傷した血管平滑筋組織の二次的再増殖を予防すると同時に、創傷の治癒も更に可能にする。

【0013】

実験は、バルーン血管形成術後の再狭窄に対する、セラミドコーティングされた塞栓除去用カテーテルの治療的能力を評価するようデザインされた。初期の研究では、時間を関数として、バルーン血管形成術後のウサギ頸動脈における再狭窄の範囲を評価した。バルーンで傷害してから1, 2, 4および6週間後に、被験動物を屠殺した。顕著な新生内膜過形成が、早くも1週目に観察され、4週目でピークに達した(図2A)。偽処理を施した(sham-treated)頸動脈は、いずれの時期でも新生内膜過形成の徴候を示さなかった。血管平滑筋の内側層にも、バルーン処理後に顕著な肥厚性の傷害が認められた。これらの結果に基づいて、バルーン傷害から2週間後に、活動的な再狭窄性VSM増殖に対するセラミドの効果が調べられた。図2B~Eは、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色したウサギ頸動脈の凍結切片を示す。偽処理を施したコントロールの動脈(図2B)に加えて、3つの処理群には、ビヒクル処理したバルーン(図2C)、C₆-セラミドでコーティングしたバルーン(図2D)、およびジヒドロ-C₆-セラミド(不活性な不活化物質)でコーティングしたバルーン(図2E)が含まれていた。驚くべきことに、C₆-セラミド処理は、バルーン血管形成術で誘発された新生内膜過形成を有意に減少させた。新生内膜/内側層比の減少に反映されるように、セラミドがバルーン誘発性の新生内膜形成を92%阻害したことが、定量分析によって明示された(図2F)。対照的に、C₆-セラミドの不活性な類似体であるジヒドロ-C₆-セラミドは、バルーン傷害後の再狭窄を減少させなかった。

(9)

。このように、阻害性効果は生物学的活性なセラミドを必要とし、構造的に類似していても不活性な脂質を用いては、繰り返すことはできない。さらに、セラミドの効果は、生物化学的作用によるものであり、親油性の性質によるものではないという仮説が立てられ得る。

【0014】

具体的に、図2では、ジヒドロ-C₆-セラミドではなくC₆-セラミドが、ウサギ頸動脈において、バルーン血管形成術後に新生内膜過形成をブロックした。初期の実験は、ニュージーランド白ウサギの頸動脈で血管形成術後に再狭窄を誘発するよう、方法を最適化した。21匹のウサギを3つの実験群に分け、ビヒクル処理したカテーテル、C₆-セラミド処理したカテーテル、またはジヒドロ-C₆-セラミド処理したカテーテルのいずれかにより、バルーン血管形成術を施行した。それぞれのウサギは、総頸動脈内皮を剥ぎ取り再狭窄を促すよう、細胞条件を確立すべく同一の手技を受けた。右総頸動脈は、偽処理コントロールとして寄与し、左頸動脈は実験側として寄与した。組織の湿重量または細胞性タンパク質含有量に関して、偽処理コントロール、ビヒクル・コントロールまたはセラミド処理した動脈の間で有意差はなかった。図2Aは、血管形成術後の再狭窄の時間的推移を示し、図2B～2Eは、代表的なH/E染色された切片を示す。左上のパネル(図2B)は、偽処理コントロールの動脈を示し、右上のパネル(図2C)は、DMSO/エタノール(1:1, v/v)コーティングしたバルーンで処理した動脈を示す。左下のパネル(図2D)は、C₆-セラミドでコーティングしたバルーンで処理した動脈を示し、右下のパネル(図2E)は、セラミドの生物学的不活性形態であるジヒドロ-C₆-セラミドで処理した動脈を示す。これらの顕微鏡写真の目盛りは、200ミクロンである。図2Fは、再狭窄病変の範囲を定量化している。

【0015】

実験的に有効な治療が臨床試験で成功できないのは、しばしば、適切な期間にわたり傷害部位に送達される治療剤が至適用量を下回るからである。さらに、治療の有効性は、膨張されたバルーンから血管病変部位にセラミドを移動させる生体力学的な力の帰結であり得る。従って、実験は、バルーンと頸動脈との間を移

(10)

動するセラミドを定量するように行われ、バルーンカテーテルから損傷動脈へのセラミドの移動および送達に関する薬物動態が評価された。 $[^3\text{H}]$ C_6 -セラミドをトレーサーとして用いると、 $70 \pm 10 \text{ nmol}$ の C_6 -セラミドが、 $5 \mu\text{mol}$ の C_6 -セラミド溶液からのゲルとしてバルーンに適用されると計算された。図3Aは、挿入および膨張された後、 $12 \pm 2 \text{ nmol}$ がバルーンに残留したことを示す。これは、血管形成術の手技の間に、およそ 58 nmol の C_6 -セラミドがバルーンカテーテルから移動したと解釈される。頸動脈内でのバルーンの膨張がセラミドの最適な移動に必須であるかどうか試験するために、非膨張バルーンを用いる外科的手技を行なった。挿入しても膨張しないバルーンで回収されたセラミド量は、 $14 \pm 3 \text{ nmol}$ であった。放射性標識した脂質で処理されたウサギ頸動脈をホモジナイズし、脂質生成物を薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分離した (図3A)。血管形成術から15分後に単離した無傷 (intact) のセラミド量は、膨張バルーン処理では $2.7 \pm 0.4 \text{ nmol}$ 、非膨張バルーン処理では $0.7 \pm 0.2 \text{ nmol}$ であった。切除した組織から回収されたセラミド量は、バルーン膨張の帰結として組織に移動したセラミド量と有意差はなかった。移動したセラミドは、頸動脈管腔容積の 0.0365 cm^3 に先ず送達されたので、バルーン傷害部位でのセラミド有効濃度は 1.5 mmol/L であると推定される。従って、バルーン膨張の結果、有効で再現可能な用量のセラミドが損傷動脈に送達できる。

【0016】

in situ オートラジオグラフィーを活用して、血管形成術後にバルーンカテーテルから移動した $[^3\text{H}]$ C_6 -セラミドの動脈浸透度を示した (図3B~3D)。非標識動脈 (パネルB) と比較して、 $[^3\text{H}]$ C_6 -セラミドは、血管形成術から15分後には動脈内側層全体で観察された (パネルC)。この時点で放射性標識の $89 \pm 4\%$ が、真正の C_6 -セラミド標品とともに移動するため、ピクセル強度のこの増加は、無傷セラミドの増加を反映する。ピクセル強度は、非膨張動脈 (パネルD) に対して膨張された動脈 (パネルC) において強度が高かった。無作為選択した10区画について、バックグラウンド値を差し引いて 1 m^2 当たりのピクセル強度で表すと、内側層の染色は、非膨張バルーンに対して

(11)

セラミドコーティングした膨張バルーンで 4.7 ± 0.2 倍増強した。これは、再度、バルーン膨張が最大の送達および浸透度をもたらすという結論を支持する。従って、脂質コーティングされたバルーンは、治療的用量のセラミドを血管伸長傷害部位の下層にある組織に送達し、細胞浸透性セラミドの短期的適用は、傷害動脈に完全に浸透して、炎症性環境にもかかわらず内膜増殖を減少させるのに十分であることを実証する。

【0017】

速やかに挿し込まれた放射性標識セラミドの分解も、TLCによって評価した。血管形成術から15分後の時点で、TLC分離された脂質の $89 \pm 4\%$ が、真正のC₆-セラミド標品とともに移動した。これは、セラミドの回収された量である $2.7 \pm 0.4 \text{ nmol}$ に相応した。血管形成術から60分後に、 $1.3 \pm 0.6 \text{ nmol}$ のセラミドが回収された。従って、50%の放射性標識がそれでも、無傷セラミドとして1時間で回収できる。セラミド量のこの減少は、TLC分離されたガングリオシドおよびセレブロシドの増量に対応し、スフィンゴシンには対応しなかった。

【0018】

注入型カテーテルは、BSAビヒクル中のセラミドを、個々の用量で動脈傷害部位に送達する利点を有することが注目される。従って、注入型カテーテルを用いて溶液で送達されるセラミドも、バルーン先端がゲルでコーティングされたカテーテルを用いて送達されるセラミドと同じく、再狭窄を減少させるのに有効であるかどうか測定された。4Fの動脈用二元管腔灌注塞栓除去用カテーテルの先端でバルーンを膨張させて、初期の実験のものと同じ直径にした。10 μM のC₆-セラミドを1分間で3回注入すると、各回ともバルーン血管形成術後に再狭窄を39%減少させた。等しい用量のジヒドロ-C₆-セラミドは、再狭窄病変に対して効果を有しなかった。これらの研究は、セラミドコーティングしたバルーンカテーテルの、動脈内部位特異的送達装置としての新規性および有効性をさらに支持する。

【0019】

血栓形成を予防するために、経皮経管冠動脈形成術に先立って、患者にはルー

(12)

チンに抗凝固薬が投与される。従って、セラミド療法の有効性に対する抗凝固薬の重要性を調べた。セラミド処理したバルーンもビヒクル処理したバルーンも、それを用いた血管形成術は血栓形成を誘発しなかった。術後7日間皮下に投与された(2.5 mg/kg)ロベノックス(低分子量ヘパリン)は、単独では再狭窄を減少させず、セラミド誘発性の再狭窄阻害を増大しなかった。セラミド処理が、抗凝固薬を用いるプロトコールおよび非処理プロトコールの両方で等しく有効であることを示唆する。

【0020】

インビボでの、VSM細胞増殖に対するセラミド処理の効果も調べられた。免疫組織化学法を使用し、平滑筋細胞特異的アクチン抗体を用いてVSM(図4A~B)を、および増殖性細胞核抗原(PCNA)抗体を用いて細胞増殖(図4C~F)を確認した。アクチン抗体で染色して陽性のものは、VSMがバルーンによる傷害で誘発される新生内膜形成の主要な成分であったことを示す(図4B)。さらに、この顕微鏡写真は、バルーン血管形成術で誘発されるこすれ(ruffling)および内側層におけるVSMの分散を示す。PCNAは、細胞周期の初期のG₁期およびS期に合成され、従って、細胞増殖のマーカーとして使用し得る。図4C~Fでは、PCNA陽性染色を示す代表的な顕微鏡写真が、コントロール、バルーン傷害、セラミド処理およびジヒドロセラミド処理された頸動脈について、それぞれ示されている。バルーンで傷害された動脈中のPCNA陽性細胞の割合(2.8±0.1%)は、コントロール血管(0.2±0.1%)に比べて劇的に増大した。ジヒドロ-C₆-セラミド(1.9±0.3%)ではなく、C₆-セラミド(0.6±0.2%)が、頸動脈の内側層ではなくて新生内膜層で、PCNA陽性細胞の数を減少させた。これらのデータは、血管壁に対して外傷を与えた後に細胞周期に入るVSMの割合を減少させることで、セラミドが新生内膜過形成を減少させることを実証する。

【0021】

具体的には、図4において、セラミド処理されたカテーテルが、血管形成術後の血管平滑筋細胞中のPCNA発現を減少させた。モノクローナル抗 α 平滑筋抗体を用いて免疫組織化学法により平滑筋アクチン発現を分析し、PCNAに対す

(13)

るマウスモノクローナル IgG2a 一次抗体を用いて PCNA 陽性細胞数を評価した。染色コントロールのスライドは、一次抗体を非特異的マウス IgG で置換し、いかなる特異的または選択的な染色も示さなかった。これらの免疫組織化学的顕微鏡写真は、4つの個々の実験を代表するものである。パネル A～B は、コントロール動脈およびバルーンで傷害された動脈それぞれに関する平滑筋アクチン染色を反映し、一方、パネル C～F は、コントロール、バルーンで傷害、セラミドコーティング・バルーンで傷害、およびジヒドロセラミドコーティング・バルーンで傷害された頸動脈をそれぞれ表している。これらの顕微鏡写真の目盛りは、200 ミクロンである。

【0022】

インビトロ研究から得られた証拠は、セラミドが、増殖因子で誘発される細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) カスケードを阻害することによって、および恐らくプロテインキナーゼ B (PKB) カスケードを阻害することによって、細胞増殖を停止することを示す。従って、セラミドが再狭窄を予防する機序を解明するために、血管形成術後、新たに切除した頸動脈を用いて、ERK2 および PKB α のリン酸化状態を調べた (図 5)。バルーン傷害から 15 分後および 24 時間後に、ERK2 および PKB α のリン酸化が増大した。これらのキナーゼの持続的なリン酸化は、損傷した動脈の継続的なリモデリングを最も良く反映する。セラミド処理後直ちに、これらのキナーゼのリン酸化状態は、活性化の基底レベル以下に減少した。従って、短期 (acute) セラミド療法は、キナーゼを直接的に調節するか、またはこれらのシグナリング経路をダウンレギュレートする推定的なセラミドで活性化されるタンパク質ホスファターゼを制御し得る。

【0023】

具体的には、図 5 において、ウサギ頸動脈におけるセラミドコーティングされたバルーン血管形成術後に、ERK2 および PKB α のリン酸化は減少した。パネル A は、リン酸化特異的抗体を用いてプローブした、ERK2 および PKB α に関する代表的なウェスタンブロットを示す。PDGF で処理した NIH3T3 細胞および未処理の NIH3T3 細胞からのライゼートを、それぞれ陽性コントロールおよび陰性コントロールとして用いた。この免疫ブロットは、全部で 8 匹

(14)

の動物を用いた類似の実験を代表している。パネルB～Cは、免疫プロットのデータを定量化している。

【0024】

C₆-セラミドは、A7r5大動脈平滑筋細胞およびラット系球体メサングウム細胞において、チロシンキナーゼ受容体関連およびGタンパク質受容体関連の両方の有糸分裂誘発を阻害するように、1L-1の効果を模倣することが既に明らかにされている。セラミド処理は、G₀G₁期で増殖停止に関連したが、これらの平滑筋様血管周囲細胞でのアポトーシスには関連しなかった。本発明は、既述の二重識別プロトコルを用いるヨウ化プロピジウム染色後に、蛍光活性化細胞選別によって評価されるように、ウサギ頸動脈から単離された一次VSMではC₆-セラミドは有意なアポトーシスを誘発しないことを示す。具体的には、5μMのMC₆-セラミドまたはジヒドロ-C₆-セラミドで24時間または40時間処理した一次ウサギVSMは、1%未満のアポトーシス性細胞死を示した。コントロールとして、オカダ酸処理(100nM)が、24時間(52%)および40時間(69%±2%)後に、アポトーシスを有意に誘発した。従って、再狭窄における細胞浸透性セラミドの治療的有効性は、アポトーシスを有意に誘発することなく、VSM増殖を停止する能力を包含する。

【0025】

他の細胞浸透性セラミド誘導体も、新生内膜過形成を制限し得る。アミド結合した脂肪アシル鎖がジメチル部分で置換されたセラミド誘導体、例えば、ジメチルスフィンゴシンも、血管形成術で誘発される傷害を制限するのに有効である。

変化したセラミド代謝は、アテローム性動脈硬化、糖尿病および癌に関連したが、セラミド類似体は、増殖性の血管疾患の治療法としては、これまで考慮されなかった。内因性セラミドを犠牲にする、ラクトシル-セラミド複合体およびグリコーセラミド複合体の高い濃度は、アテローム性動脈硬化および糖尿病のモデルで注目され、この減少したレベルのセラミドは、VSM増殖および血管狭窄と相関した。セラミドの内因性レベルの枯渇に伴い、外因性セラミド類似体の抗分裂促進性物質としての使用を検討するのは論理的である。本発明は、セラミドが、血管形成術後の再狭窄を予防する強力な候補物質であることを実証する。本発

(15)

明はまた、例えば、冠動脈、腎動脈、大腿動脈の狭窄を治療するのに有効であることが予想され、また例えば、キャリブレートされた門脈大静脈シャントとしての、あるいは冠動脈バイパスに使用される非閉塞の遮閉伏在静脈としての、静脈用の使用も有し得る。さらに、本発明は、平滑筋様細胞が網膜前部で活性化され増殖して失明をもたらす糖尿病性網膜症のような領域での使用を有し得る。局所的に送達されるセラミドはまた、長期透析後の血管アクセスラインの狭窄部での制御不能な平滑筋増殖を潜在的に治療するのに使用し得る。これらの薬剤を、注入ポートを介してバルーンカテーテルの先端に送達する、又はステントにコーティングするのに加えて、これらの抗分裂促進性のスフィンゴ脂質誘導体は、従来のリポソームベクターまたはカチオン性リポソームベクターの成分として送達され得、遺伝子転移および標的化戦略の有効性を潜在的に増強させる。

【0026】

従って、本発明は、セラミドまたは他の増殖停止性であり脂質に由来する誘導体が、バルーンおよびステントをコーティングすることによって局所的に投与されるとき、傷害部位での平滑筋細胞増殖を阻害することを実証する。さらに、注入用カテーテルまたは微小孔カテーテル設計によって、セラミドまたは他の増殖停止性脂質由来生物学的活性物質が、定められた量で送達され得る。注入用カテーテルは、膨張されたバルーンから遠位のポートを介して、その物質を送達する。微小孔カテーテルは、バルーン表面上の微小孔を介して物質を送達する。さらに、本発明の物質は、2つの膨張バルーン間で隔てられた損傷動脈壁に物質を送達するためのダブルバルーン、注入ポート、カテーテル設計により送達し得る。本発明の好ましい実施態様によれば、細胞浸透性セラミドであるC₆-セラミドは、血管形成術部位での平滑筋細胞増殖を阻害する。或いは、他の細胞浸透性セラミド誘導体も、新生内膜過形成を制限し得る。アミド結合した脂肪アシル鎖がジメチル部分で置換されたセラミド誘導体も、血管形成術で誘発された傷害を制限するのに有効である。

(16)

【図 1】

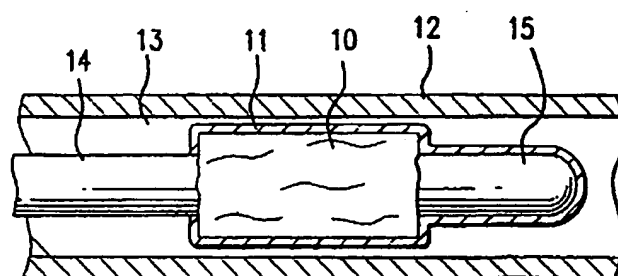
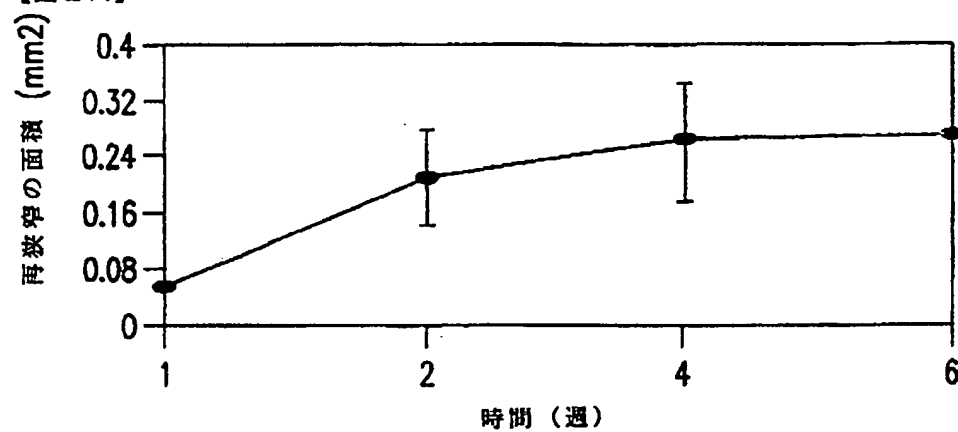


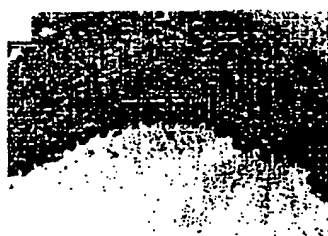
FIG.1

【図 2 A】



【図 2 B】

FIG.2B



(17)

【図 2 C】

FIG.2C



【図 2 D】

FIG.2D



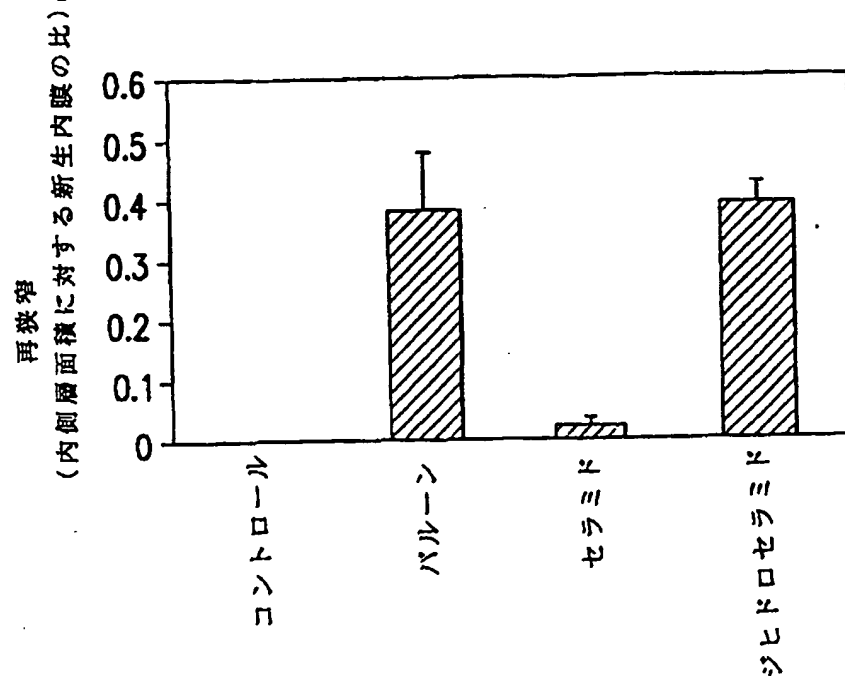
【図 2 E】

FIG.2E

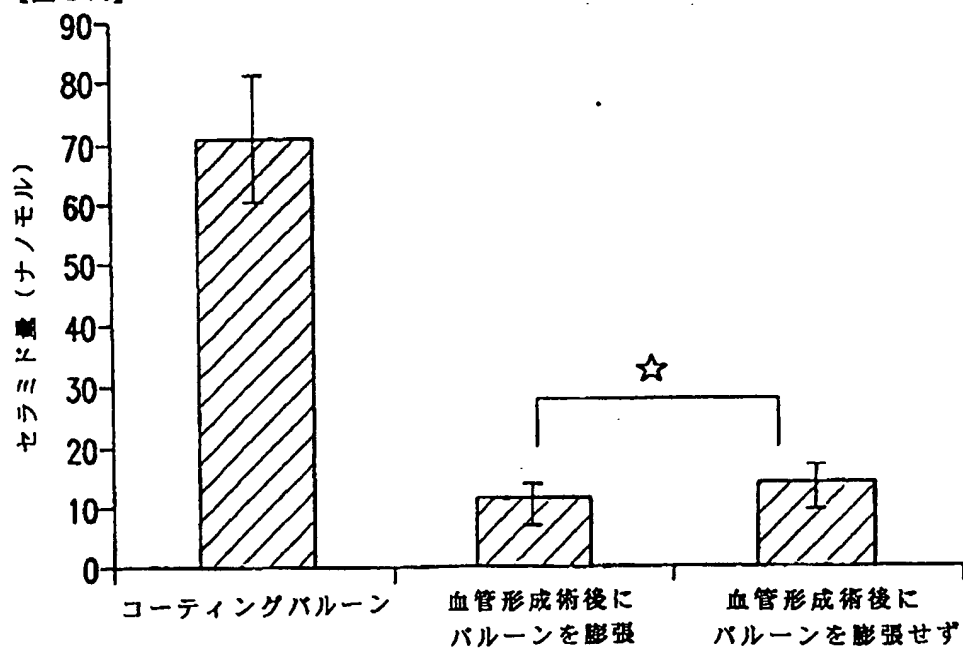


(18)

【図2F】

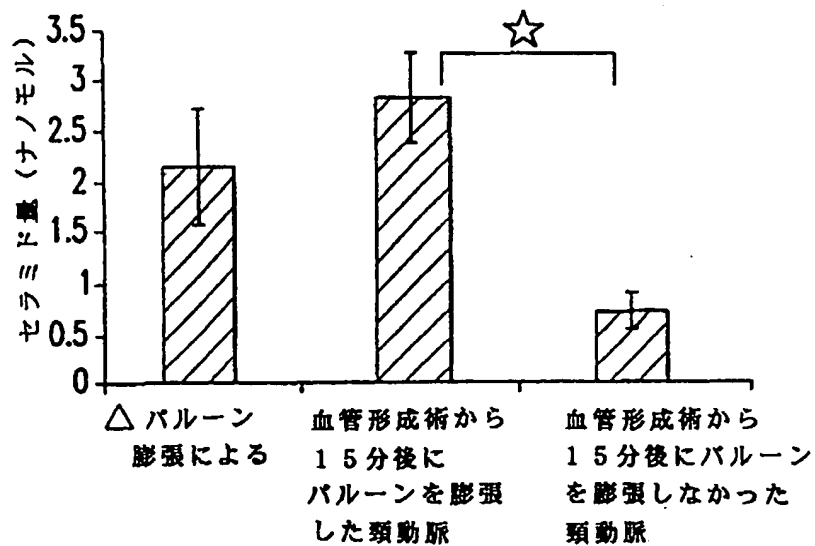


【図3A】



(19)

【図3A1】



【図3B】

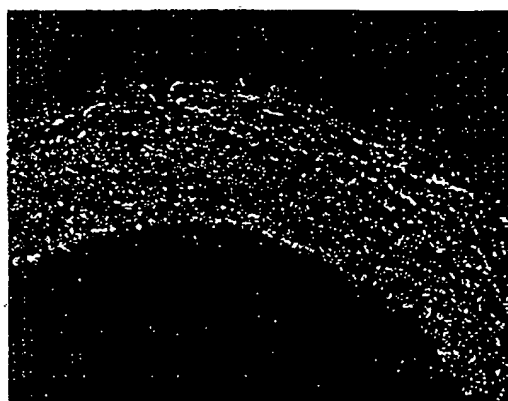


FIG.3B

(20)

【図 3 C】

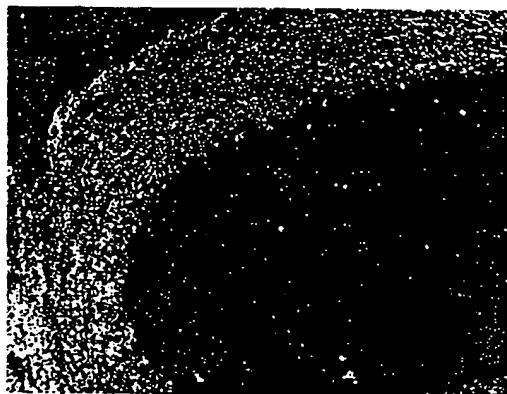


FIG.3C

【図 3 D】

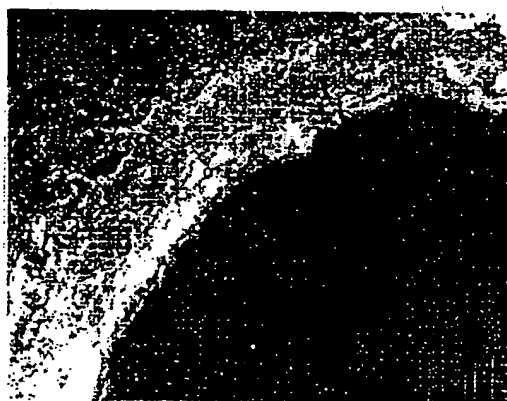


FIG.3D

【図 4 A】

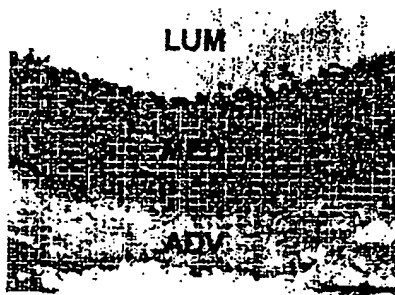


FIG.4A

(21)

【図 4 B】

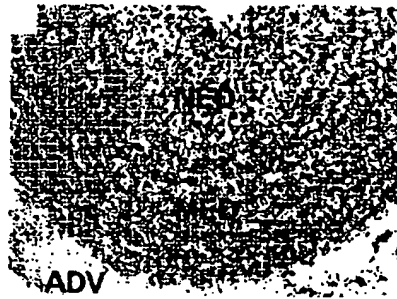


FIG.4B

【図 4 C】

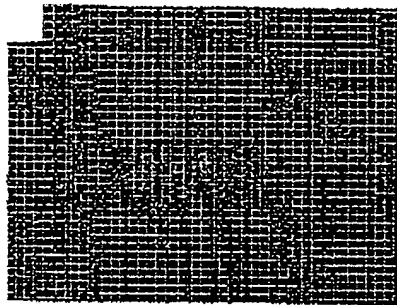


FIG.4C

【図 4 D】

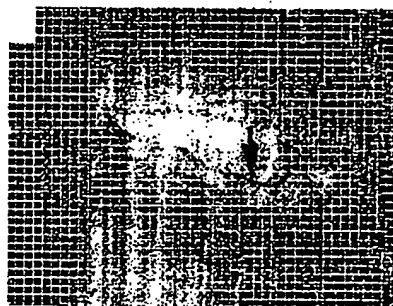


FIG.4D

(22)

【図 4 E】

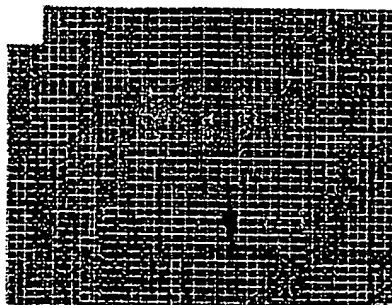


FIG.4E

【図 4 F】

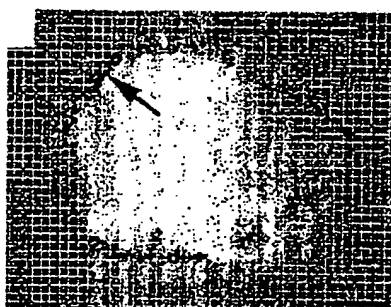
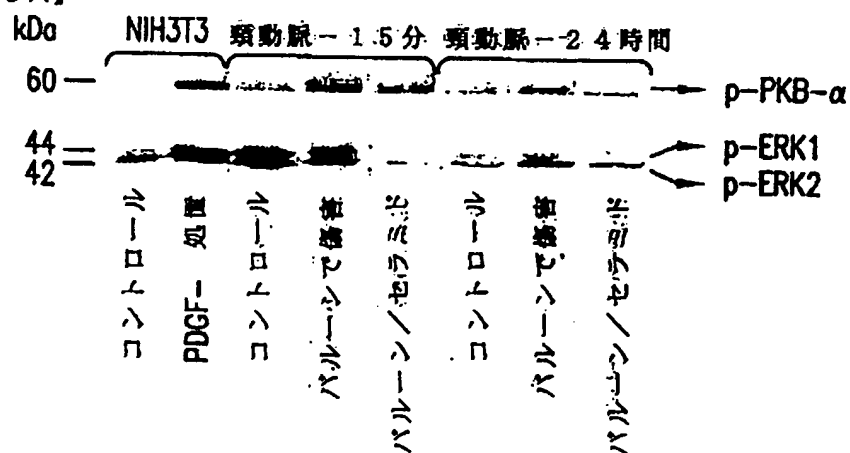


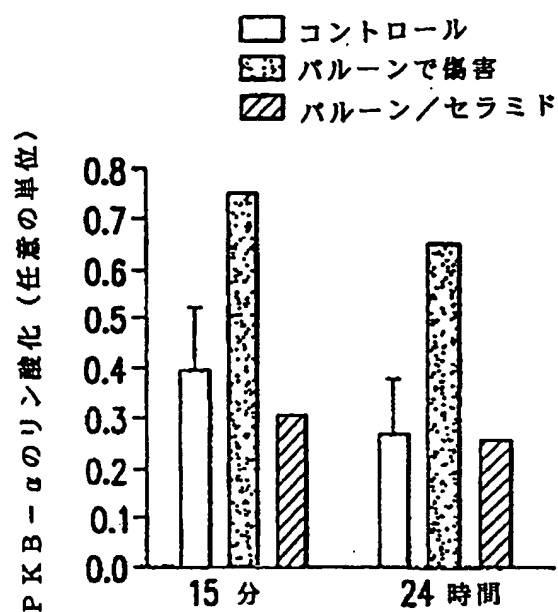
FIG.4F

【図 5 A】

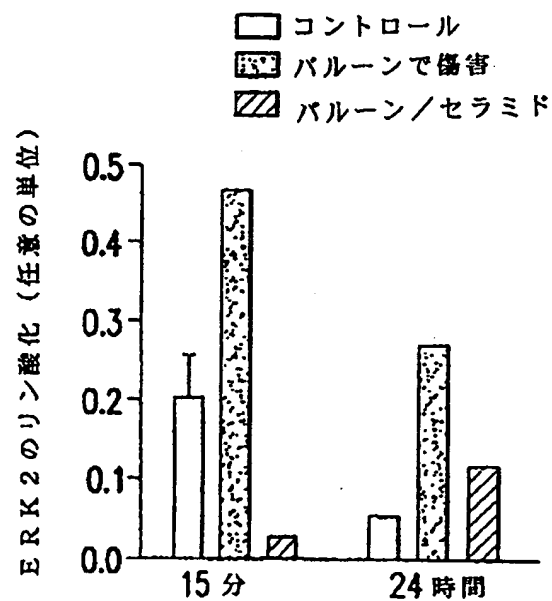


(23)

【図5B】



【図5C】



(24)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/27565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Y) : A61M 25/00 US CL : 606/108, 109, 194 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 606/108, 109, 194 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NONE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	US 5,509,899 A (FAN et al) 23 April 1996, entire document.	1-18		
A	US 5,634,901 A (ALBA et al) 03 June 1997, entire document.	1-18		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but tending to undermine the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but tending to undermine the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but tending to undermine the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 09 DECEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 22 JAN 2001		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 305-9230		Authorized officer KEVIN TRUONG Telephone No. (703) 305-3767		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1993)

(25)

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4C081 AB12 AC08 AC10 BA02 BA05
CE03 CE05 DC03 EA06
4C167 AA01 AA50 AA52 BB02 BB05
BB06 BB12 BB26 CC08 CC09
DD01 GG16